云 南 植 物 研 究 2002，24（6）：775～780
Acta Botanica Yunnanica

康乃馨 ACC 氧化酶 cDNA 的克隆及其反义植物表达载体的构建*

张树珍[1,2]，汤火龙[2]，杨本鹏[2]，刘飞虎[1]
（1 云南大学生命科学与化学学院，云南 昆明 650091；2 中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室，海南 海口 571101）

摘要：以康乃馨（*Dianthus caryophyllus* L.）花瓣为材料，用改进的异硫氰酸胍一步法提取总 RNA，根据已报道的康乃馨 ACC 氧化酶（1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase，ACO）基因的序列设计并合成一对引物，通过 RT-PCR 方法获得一约 1.2kb 特异片段，把该片段连接到 pGEM(R)-T easy vector 上进行测序，其全长共 1156bp，编码区 915 bp，共编码 304 个氨基酸残基。序列分析结果表明该序列与 GenBank L35152 中的康乃馨 ACC 氧化酶基因的 cDNA 序列完全相符，推断该基因在康乃馨种内可能是完全或高度保守的。随后将此片段反向插入植物表达载体 pBI121 的 35S 启动子和 NOS 终止子之间，构建了一反义植物表达载体 pBO；又把花特异表达启动子 PchsA 插入 pBI121 的 HindIII + XbaI 位点构建中间载体 pCHB，再把康乃馨 ACC 氧化酶基因反向插入中间载体 pCHB 的 XbaI + Sst1 位点构建成另一反义植物表达载体 pCBO。

关键词：康乃馨；ACC 氧化酶；RT-PCR；反义植物表达载体
中图分类号：Q 75，Q 945 **文献标识码**：A **文章编号**：0253－2700(2002)06－0775－06

Cloning of a ACC Oxidase Gene from Carnation Flowers and Construction of It's Antisense Plant Expression Vectors

ZHANG Shu-Zhen[1,2]，TANG Huo-Long[2]，YANG Ben-Peng[2]，LIU Fei-Hu[1]
（1 *College of Life Science and Chemistry*，*Yunnan University*，Kunming，650091，China；
2 *National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops*，*CATAS*，Haikou 571101，China）

Abstract：Total RNA was extracted from petals of Carnation（*Dianthus caryophyllus* L.）and reverse transcripted to first strand of cDNA. For getting the 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic acid Oxidase（ACO）cDNA，a pair of primer was designed and synthesized according to the sequence reported. The PCR product of the ACO cDNA was obtained by using the first strand of cDNA as template. This product was ligased to pGEM(R)-T easy vector and sequenced. The sequencing data showed that the PCR product was 1156bp，which containing a 915bp coding region and encoding 304 predicted amino acid residues. Comparation of the cDNA sequence from this experiment with that reported by GenBank L35152 indicated the homology

* 基金项目：中国博士后基金资助项目
收稿日期：2002－02－21，2002－05－10 接受发表
作者简介：张树珍（1965－）女，博士，主要从事植物抗逆保鲜基因工程和植物生物反应器的研究。

was 100%. We give the results that this ACO gene among the species of *Dianthus caryophyllus* L. is highly conserved. The ACO gene antisense sequence was then inserted between the CaMv 35S promoter and NOS terminator into the expression vector pBI121. This expression vector called pBO；Then the flower-specific promoter PchsA was first inserted into the sites of the expression vector pBI121/HindIII + XbaI，This recombinant plasmid called pCHB，then inserted the ACO antisense gene into the sites of the plasmid pCHB/XbaI + SstI. Hence the antisense plant expression vector pCBO was constructed.

Key words：Carnation；ACC oxidase；RT-PCR；Antisense plant expression vector

康乃馨是一种典型的呼吸跃变型花卉，乙烯是其内源的衰老激素，花瓣衰老的最初反应之一便是自动催化而产生乙烯，一方面是衰老过程产生乙烯，另一方面是产生的乙烯又激活与衰老相关基因的表达进一步促进其衰老，并导致花朵最终凋谢变质（Borochov 等，1989；Hanan 等，1993）。康乃馨花瓣衰老是植物在生理控制下的一种程序性器官死亡，在程序性器官死亡的过程中蛋白酶、脂酶和核酸酶在降解蛋白质、脂肪和核酸中起重要作用（Borochov 等，1989）；康乃馨花的衰老受乙烯的诱导，主要是由于乙烯能诱导康乃馨花瓣半胱氨酸蛋白酶的表达，进而促使其蛋白质发生降解而启动花瓣的衰老（Jones 等，1995）；乙烯能诱导康乃馨花瓣中脂酰基水解酶的表达，该酶对膜脂的脱脂作用使得膜的完整性发生变化，因而启动其花瓣的衰老（Hong 等，2000）；Orzaez 等（1997）证实乙烯在花瓣的衰老过程中还调节着 DNA 的断裂，类似于动物中的编程式死亡。因而控制康乃馨切花乙烯的生物合成，是延缓切花的衰老、延长其保鲜期的一条主要途径。ACC 氧化酶催化植物乙烯合成的最后一步即将 ACC（1－氨基环丙烷－1－羧酸）转化为乙烯。最新的研究表明，IAA 能够促进乙烯产量的增加是通过乙烯自身诱导了 ACO 基因的转录，ACO 可能也是乙烯生物合成途径中的一个限速酶，并且 ACO 基因的表达是非组成型的，其转录水平上的调控可能控制着乙烯的生成速率（Arjen 等，1997）。利用反义 RNA 技术把康乃馨 ACC 氧化酶基因反向导入康乃馨优良品种中，可在一定程度上抑制其内源 ACC 氧化酶基因的表达，而抑制乙烯的生物合成，进而延缓其切花的衰老，从而使康乃馨切花的保鲜期得以延长。将康乃馨 ACC 氧化酶基因反向导入康乃馨中，获得了衰老延缓的康乃馨新品系（Cornish 等，1991）。但国内还未见有这方面的报道。

为此我们首先采用 RT-PCR（Reverse transcription polymerase chain reaction）技术分离、克隆了康乃馨 ACC 氧化酶的 cDNA 并进行了序列分析，该序列与 GenBank L35152 中康乃馨 ACC 氧化酶基因的 cDNA 序列完全相符。推断该基因在康乃馨种内可能是完全或高度保守的。在此基础上，我们把康乃馨 ACC 氧化酶基因的 cDNA 序列分别以反向插入 CaMV 35s 启动子和花特异表达启动子 PchsA 的后面构建了两个反义植物表达载体，准备用于转化康乃馨优良品种，以获得能延长插瓶寿命的康乃馨新品种。

1 材料与方法

1.1 材料

康乃馨（*Dianthus caryophyllus* L.）切花取自云南农业大学花卉所；质粒载体 pBI121、pGEM-T vector system、RNA 提取试剂盒、AMV RTase 和 Oligo（dT）$_{15}$为 Promega 公司产品，Taq DNA 聚合酶、dNTPs、各种限制性内切酶和 PCR markers 购自华美生物产品公司，PCR 产物纯化试剂盒购自大连宝生物工程公司，其

他化学常规试剂为国产分析纯。受体菌菌株 *E. coli* XLI blue 由实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 康乃馨花瓣总 RNA 的提取及电泳分析　RNA 的提取采用 Promega 公司的总 RNA 提取试剂盒（RNAgents$^{(R)}$ Total RNA Isolation System），方法按产品使用说明。RNA 的电泳采用甲醛凝胶电泳。

1.2.2 cDNA 第一链的合成　在一个 0.5 ml 的 Eppendof 管中加入 1 μg RNA（10 μl）和 1 μg Oligo（dT）$_{15}$（0.5 μg/μl，Promega 公司产品），加 Rnase-free H_2O 至 15 μl，置 70℃水浴 5 min 后冷却至室温，再依次加入：5 × first strand buffer 5 μl、2.5 mM dNTPs 1 μl、rRNasin（40 u/μl）1 μl、40 mM 焦磷酸钠 2.5 μl、AMV 反转录酶（90 u/μl）0.5 μl，再加水至终体积为 25 μl，于 42℃水浴 60 min，95℃水浴 5 min 以灭活反转录酶，置 -20℃备用。

1.2.3 PCR 扩增　PCR 扩增所用引物是根据 GenBank L35152 中的康乃馨 ACC 氧化酶的 cDNA 序列设计的并由上海生工生物工程公司合成，引物序列为：上游引物 P1：5′GCTCTAGATTTTGTTTATGTTTATGT 3′，下游引物 P2：5′GGGAGCTCACTTAAAAGGAAGCTCT3′，以合成的 cDNA 第一链为模板，采用 Taq DNA polymerase 进行扩增，反应体系为：cDNA 第一链反应液 10 μl，Taq DNA polymerase buffer 5 μl，2.5 μM $MgCl_2$（A351B）4 μl，2 mM dNTPs 4 μl，P1（10 pmol/μl）2.5 μl，P2（10 pmol/μl）2.5 μl，Taq DNA polymerase（5 u/μl）0.5 μl，ddH_2O 16.5 μl，总体积为 50 μl。反应条件为：预变性 94℃，5 min；循环参数为 94℃，1 min；51℃，40 s；72℃，1 min 20 s；35 cycles，最后 72℃，10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后，切下目的带，用 PCR 产物纯化试剂盒回收。

1.2.4 PCR 产物的序列测定　把纯化出的目的片段与 pGEM$^{(R)}$-T easy vector 相连，再转化 *E. coli* XL1 blue，挑取白色菌落，碱法提取质粒，电泳后取滞后质粒用 EcoRI 内切酶酶切分析，挑出能切出约 1.2kb 片段的菌落，大量提取质粒并经 PEG 纯化后，用 ABI377 型自动测序仪进行测序。

1.2.5 康乃馨 ACC 氧化酶 cDNA 反义植物表达载体的构建

A. 反义植物表达载体 pBO 的构建　将重组质粒 pGO5 用 XbaI + SacI 完全酶解后电泳回收小片段（含目的基因）；pBI121 质粒也用 XbaI + SacI 酶切，电泳回收大片段，然后进行定向连接反应，连接产物转化 *E. coli* XL1 感受态细胞、碱法提取质粒，取电泳谱带滞后的质粒 DNA 作 XbaI + SacI 酶切图谱分析。

B. 反义植物表达载体 pCBO 的构建　先将表达载体 pBI121 用 HindIII + XbaI 酶解完全，回收大片段；再把带有花特异表达启动子的质粒 pCHSAP 也用 HindIII + XbaI 酶切完全，回收小片段（含 PchsA 启动子），然后进行定向连接，连接产物转化 *E. coli* XL1，用上述同样方法筛选出重组质粒 pCHB，pCHB 又用 XbaI + SacI 完全酶解，电泳回收大片段；pGO5 用 XbaI + SacI 酶切，再电泳回收小片段，然后进行定向连接，连接产物转化 *E. coli* XL1，碱法提取质粒，取电泳谱带滞后的质粒 DNA 作酶切图谱分析。

2 结果与分析

2.1 RNA 的完整性

从康乃馨花瓣提取的总 RNA 用紫外吸收法测定其浓度及 OD_{260}/OD_{280} 比值。RNA 的提取利用 Promega 公司的总 RNA 提取试剂盒，该法采用异硫氰酸胍和 β－巯基乙醇两种 RNase 抑制剂来抑制 RNase 活性，同时异硫氰酸胍和十二烷基肌氨酸钠的联合使用，将促使核蛋白复合体的解离，使 RNA 与蛋白质分离，并将 RNA 释放到溶液中。由于 RNA 在碱性条件下不稳定，因而整个提取过程中反应体系始终保持酸性至中性，而在该环境下 DNA 极少发生降解，同蛋白质一起变性后被离心下来，RNA 仍溶于上清液中，最后可用异丙醇加以沉淀。该法通过苯酚/氯仿/异戊醇两次抽提，提取的总 RNA 纯度高，OD_{260}/OD_{280} 比值为 1.90，通过甲醛凝胶电泳分析，产生 3 条清晰条带，其中 28srRNA 的亮度约

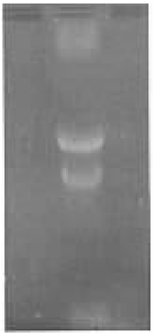


图 1 康乃馨花瓣 RNA 甲醛凝胶电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel of formaldehyde electrophoretogram for RNA of Carnation petals

为 18srRNA 的两倍（图 1），说明利用该法所提取的总 RNA 不仅纯度高而且完整性好，完全可满足逆转录 cDNA 的要求。

2.2 PCR 产物的鉴定

将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析，其扩增片段大小约 1.2kb（图 2），与设计的结果相符。将此片段回收后与 pGEM(R)-T-easy vector 相连，获得重组质粒 pGO5，pGO5 经 EcoRI 酶切能切下约 1.2kb 的片段，说明 1.2kb 片段已经插入 pGEM(R)-T-easy vector 中。

2.3 序列测定及分析

本实验所获得的康乃馨 ACC 氧化酶 cDNA 经序列测定，该片段全长 1156bp，包含 915 bp 的编码序列，编码 304 个氨基酸。经比较该序列与 GenBank L35152 中的序列完全一致，说明我们得到的康乃馨 ACC 氧化酶的 cDNA 是正确的，并推断该基因在康乃馨种内可能是完全或高度保守的（序列略）。

2.4 康乃馨 ACC 氧化酶基因反义植物表达载体的构建

康乃馨 ACC 氧化酶的反义基因插入植物表达载体 pBI121 的 XbaI + SacI 位点后（即取代了 pBI121 中的 GUS 基因），转化 *E. coli* XL1 感受态细胞，经筛选转化子，用滞后质粒作 XbaI + SacI 双酶切鉴定，所切下的片段大小与预期结果相符，说明构建正确，该重组质粒被命名为 pBO。反义植物表达载体 pBO 的质粒图谱如图 3 所示，其酶切鉴定结果见图 4。

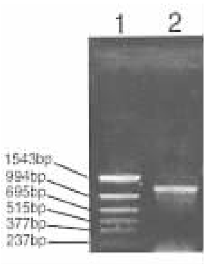


图 2 PCR 产物电泳谱带

Fig. 2 Agarose gel electrophoretogram of PCR products

1. PCR Markers；2. PCR products of cDNA encoding ACC oxidase of Carnation

另外再用花特异表达启动子 PchsA 取代植物表达载体 pBI121 中的 CaMV 35S 启动子，构建成带花特异表达启动子的植物表达载体 pCHB；同样再把康乃馨 ACC 氧化酶的反义基因插入花特异表达启动子的植物表达载体 pCHB 的 XbaI + SacI 位点后（即取代了 pCHB 中的 GUS 基因），转化 *E. coli* XL1 感受态细胞，经筛选转化子，其滞后质粒分别用 XbaI + SacI 和 HindIII + XbaI 双酶切鉴定，所切下的片段分别约为 1.2kb 和 0.5kb，均与预期结果相符，该质粒即为花特异表达的康乃馨 ACC 氧化酶基因反义植物表达载体，命名为 pCBO。康乃馨 ACC 氧化酶基因反义植物表达载体 pCBO 的图谱如图 5 所示，其酶切鉴定结果见图 6。

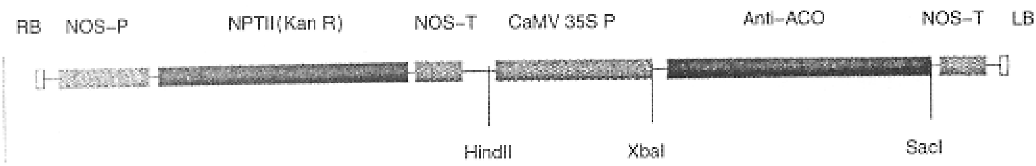


图 3 康乃馨 ACC 氧化酶基因反义植物表达载体 pBO 的质粒图谱

Fig. 3 Carnation ACO Antisense plant expression vector pBO

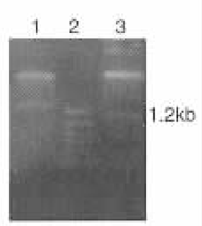


图 4　酶切鉴定反义植物表达载体 pBO

Fig. 4　Detection of the antisense expression vector pBO by enzymatic digestion

1. pBI121/XbaI + SacI；2. PCR Markers（1543bp，994bp，695bp，515bp，377bp，237bp）；3. pBO/XbaI + SacI

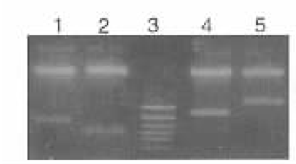


图 6　酶切鉴定反义植物表达载体 pCBO

Fig. 6　Detection of the antisense expression vector pCBO by enzymatic digestion

1. pBI121/HindIII + XbaI；2. pCBO/HindIII + XbaI（500bp）；3. PCR Markers（1543bp，994bp，695bp，515bp，377bp，237bp）；4. pCBO/XbaI + SacI（1. 2kb）5. pBI121/XbaI + SacI

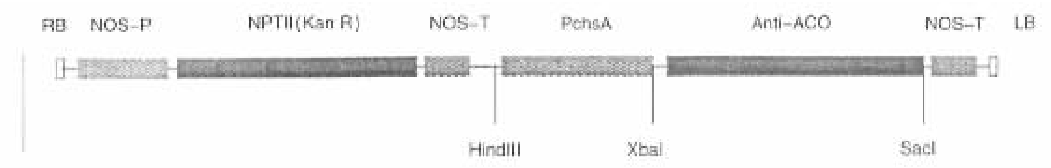


图 5　康乃馨 ACC 氧化酶基因反义植物表达载体 pCBO 的质粒图谱

Fig. 5　Carnation ACO Antisense plant expression vector pCBO

3　讨论

康乃馨是一种典型的呼吸跃变型花卉，乙烯是其内源的衰老激素。利用反义 RNA 技术抑制其乙烯的生物合成从而延长鲜切花的观赏寿命，在理论上是可行的。国外 Cornish 等（1991）已将康乃馨 ACC 合成酶基因反向导入康乃馨中，获得了衰老延缓的康乃馨新品种。但国内还未见有这方面的报道。我们拟利用反义 RNA 技术把康乃馨 ACC 氧化酶基因反向导入康乃馨中，以获得能延长切花插瓶寿命的康乃馨新品种。我们首先采用 RT－PCR（Reverse transcription polymerase chain reaction）技术分离、克隆了康乃馨 ACC 氧化酶的 cDNA 并进行了序列分析，该序列与 GenBank L35152 中的康乃馨 ACC 氧化酶基因的 cDNA 序列完全相符，推断该基因在康乃馨种内可能是完全或高度保守的。这提示我们，可利用该基因的反义基因在康乃馨的任何品种（*Dianthus caryophyllus* L.）的转基因计划中，它不受品种类群的限制。

康乃馨 ACC 氧化酶基因在自然衰老过程中是在花器官中被诱导表达（Arjen 等，1997）。如采用组成型启动子驱动康乃馨 ACC 氧化酶的反义基因在康乃馨中表达，那么该反义基因在康乃馨发育的任何时期及植株的任何部位均可表达，它的表达不仅造成植株内部资源的浪费，可能还会在一定程度上影响植株的正常生长。如果采用花特异表达启动子驱动康乃馨 ACC 氧化酶的反义基因在康乃馨花中特异表达，而在植株的其它部位并不表达，这样不会造成植株内部资源的浪费，从而不影响植株的正常生长，也因其只特异地在花中表达，只抑制花中乙烯的生物合成，延长花期的效果可能会更好。PchsA 是光依赖性

的并在花器官中特异表达的启动子，在 UV 诱导条件下也在实生苗中低水平的表达（Ingrid 等，1990）。有鉴于此，我们分别以组成型的 CaMV 35 启动子和花特异表达启动子 PchsA 为启动子构建康乃馨 ACC 氧化酶基因的反义植物表达载体转化康乃馨，目的在于进一步比较康乃馨 ACC 氧化酶反义基因的组成型表达和组织特异性表达（即花特异表达）对其目的基因表达的抑制效果，以便能更好地筛选出耐储运、保鲜期长的康乃馨新品种。同时也可为应用反义 RNA 技术培育植物新品种在选择表达调控元件方面提供一定依据。目前遗传转化康乃馨栽培品种的工作正在进行当中。

〔参 考 文 献〕

Arjen ten Have，Ernst JW，1997. Ethylene biosynthetic genes are differentially expressed during carnation（*Dianthus caryophyllus* L.）flower senescence［J］. *Plant Molecular Biology*，**34**：89—97

Borochov A，Woodson WR，1989. Physiology and biochemistry of flower petal senescence［J］. *Hort Rep*，**11**：15—43

Cornish EC，Baudinette SC，Graham WM，*et al*，1991. Expression of antisense ethylene forming enzyme in transgenic carnation［A］. 31st Annual General Meeting of the Australian Society of Plant Physiologists，Australian National University［C］，2 – 4 October Australian National University，abstract No. 65

Hanan Itzhaki，William R，Woodson，1993. Characterization of an ethylene-responsive glutathione S-transferase gene cluster in carnation［J］. *Plant Molecular Biology*，**22**：43—58

Hong Y，Wang TW，Hudak KA，*et al*，2000. An ethylene-induced cDNA encoding a lipase expressed at the onset of senescence［J］. *Proc Natl Acad Sci USA*，**97**（15）：8717—8727

Ingrid M，van der Meer，Cornelis E. Spelt，*et al*，1990. Promoter analysis of the chalcone synthase（chs A）gene of *Petunia hybrida*：a 67 bp promoter region directs flower-specific expression［J］. *Plant Molecular Biology*，**15**：95—109

Lones ML，Larsen PB，Woodson WR，1995. Ethylene-regulated expression of a carnation cysteine proteinase during flower petal senescence［J］. *Plant Mol Biol*，**28**（3）：505—512

Orzaez D，Granell A，1997. DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in *Pisum sativum*［J］. *The Plant Jour*，**11**（1）：137—144